製品コード CY224

研究用

TaKaRa

CycleavePCR®
ウシ白血病ウイルス (BLV)
検出キット

説明書

v201103Da

ウシ白血病ウイルス（bovine leukemia virus；BLV）は、血液や乳汁の B リンパ球の DNA にプロウイルスとして組み込まれるレトロウイルスです。日本においてこのウイルスに感染したウシの割合は、20% と言われており、感染してから発症までが 5 〜 10 年以上と長く、また、治療法が確立されていないことから、このウイルスが引き起こす畜産農家への経済的損失は非常に深刻です。

本製品は、*tax* 遺伝子をターゲットとして、プロウイルスとして組み込まれたウシ白血病ウイルス（BLV）をリアルタイム PCR 装置を用いて検出するためのキットです。増幅反応には Hot Start PCR 用酵素、*TaKaRa Ex Taq*® Hot Start Version を使用していますので、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができます。増幅産物の検出にはサイクリングプローブ法を採用しています。サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出方法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することが出来ます。プローブは片方の端が蛍光物質で、もう片方の端がその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されています。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、配列が相補的な増幅産物とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることにより、強い蛍光を発するようになります（図 1 参照）。この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をモニターすることが出来ます。

※ 本製品は独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所との共同研究の成果に基づき、タカラバイオが製品化しました。

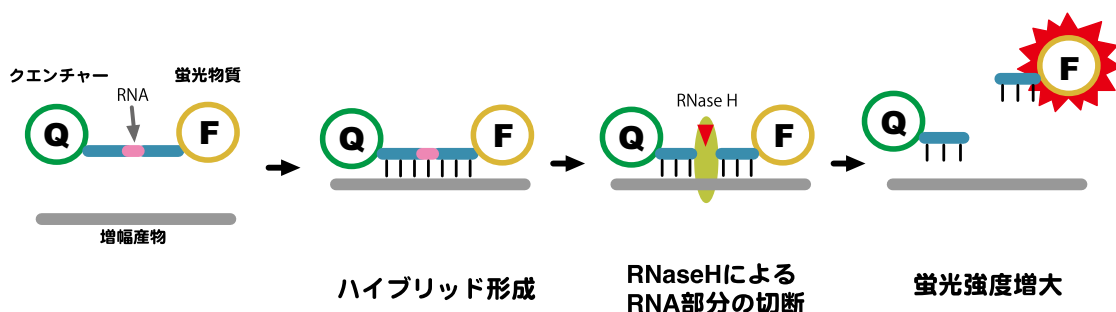



図 1．サイクリングプローブ法の原理

I. キットの内容（25 μl 反応× 50 回分）

1.	2 × CycleavePCR® Reaction Mix for BLV	625 μl
2.	Probe/Primer Mix for BLV（5 ×）＊1	250 μl
3.	dH_2O	500 μl
4.	ROX Reference Dye	25 μl
5.	ROX Reference Dye II	25 μl
6.	Positive Control（2 × 10^5 copies/μl）＊2	100 μl
7.	EASY Dilution（for Real Time PCR）	1000 μl

＊1：蛍光標識プローブを含んでいますので遮光に留意してください。
＊2：リアルタイム PCR コンポーネント（1 ～ 5）に誤って混入すると、正しい検出反応を行うことができなくなります。リアルタイム PCR コンポーネント（1 ～ 5）は付属のキットケースに移し、別個に保存するようにしてください。

【コンポーネントの説明】

2 × CycleavePCR® Reaction Mix for BLV：
酵素、Buffer、dNTP mixture を含む PCR 反応試薬です。酵素が含まれていますので、融解させる際、vortex で撹拌しないようにしてください。

Probe/Primer Mix for BLV：
ウシ白血病ウイルス（BLV）の *tax* 遺伝子を検出するためのプライマー・プローブの混合溶液です。プライマーにより、*tax* 遺伝子（ターゲット遺伝子）を増幅し、FAM 標識プローブにより検出します。

dH_2O：滅菌水です。

ROX Reference Dye、ROX Reference Dye II：
Life Technologies 社製リアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。ABI PRISM® 7000/7700、7300 Real-Time PCR SystemやStep One™/Step One Plus™ Real Time System には ROX Reference Dye を、7500 Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を用いてください。
Thermal Cycler Dice® Real Time System では必要ありません。

Positive Control：
ウシ白血病ウイルス *tax* 遺伝子用陽性コントロールです。コピー数は、A_{260} の吸光度から換算した便宜上の指標です。

EASY Dilution（for Real Time PCR）：
検量線作成用のスタンダードを調製する際の鋳型 DNA の希釈溶液です。鋳型 DNA を滅菌水や TE で希釈すると、チューブへの吸着などにより正確な希釈ができない場合がありますが、本品を用いると低濃度までの正確な希釈が可能となります。また、本品は、キャリアーとして tRNA や rRNA などの核酸を使用していないので、それらの配列に起因する非特異的増幅の問題が生じることもありません。

II. 保存　－ 20℃（輸送、保存とも）

III. キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）

【機器】

リアルタイム PCR 用増幅装置および専用チューブ

- Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
  解析には食品環境検査用ソフトウェア Ver.1（日本語表示）、または Thermal Cycler Dice® Real Time System Software Ver.3.0 を用いてください。
- ABI 7500 Real-Time PCR System（Life Technologies 社）など

0.2 ml リアルタイム PCR 用チューブ

- 0.2 ml 8-strip tube, individual Flat caps（製品コード NJ600）
  チューブ 1 本ごとにフラットキャップが付いているキャップ付き 8 連 0.2 ml チューブを Thermal Cycler Dice® Real Time System 専用として販売しています。チューブ間のコンタミの危険性が軽減できるので特にお勧めします。

1.5 ml チューブ

【試薬】

DNA 調製キット（各社）

【その他】

1000 μl、200 μl、20 μl、10 μl 各マイクロピペット
マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）
卓上遠心機
微量高速遠心機（4℃設定が可能なもの）

IV. 操作上の注意

1）リアルタイム PCR 用増幅装置の取扱いは各装置の取扱い説明書に従ってください。

2）万一、キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。

3）反応液の調製から検出まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。各エリアにおいては、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

◎ エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
◎ エリア 2：検体の調製を行います。
◎ エリア 3：検体の反応液への添加と、反応および検出を行います。

本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。また、コンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

4）本キットはリアルタイム PCR 用増幅装置での解析によって結果判定を行います。
リアルタイム PCR 用増幅装置の各種 Auto 機能が適正に働かなかった場合は誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 用増幅装置の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。

V. 操作

V-1. サンプルの調製（エリア 2 で実施）

ウシから採取した血液より、市販の血液からの DNA 調製キットを使用して、または溶血処理・遠心操作により集めた白血球画分より DNA を調製する。
１回の反応には、100 ng 以下の DNA を用いる。

V-2. 反応液の調製と反応開始

（1） 下記に示す反応液を氷上で調製する。（エリア 1 で実施）
検体サンプル以外のコンポーネントを必要本数＋α 調製し、各反応チューブに 20 μl ずつ分注する。必要本数は、サンプル数＋ 2 本（Positive Control、ネガティブコントロールとして滅菌水を加えたもの）と設定する。

【Thermal Cycler Dice® Real Time System の場合】

	液量（1 反応）		最終濃度
2 × CycleavePCR® Reaction Mix for BLV	12.5 μl		1 ×
Probe/Primer Mix for BLV（5 ×）	5 μl		1 ×
検体サンプル or Positive Control or 滅菌水	(5 μl)	＊	
dH_2O	2.5 μl		
Total	25 μl		

＊：検体サンプル等の鋳型は、この段階では加えない。

【Life Technologies 社製リアルタイム PCR 装置の場合】

	液量（1 反応）		最終濃度
2 × CycleavePCR® Reaction Mix for BLV	12.5 μl		1 ×
Probe/Primer Mix for BLV（5 ×）	5 μl		1 ×
検体サンプル or Positive Control or 滅菌水	(5 μl)	＊1	
ROX Reference Dye/ROX Reference Dye II ＊2	0.5 μl		
dH_2O	2 μl		
Total	25 μl		

＊ 1：検体サンプル等の鋳型は、この段階では加えない。
＊ 2：ABI PRISM® 7000/7700、7300 Real-Time PCR SystemやStep One™/Step One Plus™ Real Time System には ROX Reference Dye を、7500 Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を 1 反応あたり 0.5 μl を用いる。

（2） ネガティブコントロールとして、滅菌水 5 μl を（1）で分注した反応液 1 本に添加し、しっかり蓋をする。（エリア 3 へ移動）

（3） サンプル (鋳型) および陽性コントロールの添加（エリア 3 で実施）
サンプルや Positive Control を (1) で分注した反応液にそれぞれ添加し、しっかり蓋をする。

（4） 反応チューブを卓上遠心機で軽く遠心して、リアルタイム PCR 装置にセットする。

【注意】反応液調製後、なるべく 1 時間以内に反応を開始する。

<使用上の注意>
検体サンプルの DNA 量が多すぎたり、不純物が含まれている場合、蛍光シグナルが反応初期より徐々に上昇するため、その結果、ベースラインによる補正が正しく行われず、増幅曲線の形がシグモイド型にならず、正しい判定ができない場合があります。
１回の使用する DNA 量は最大 100 ng までで行ってください。
もし増幅曲線の形がシグモイド型でない場合は、サンプル DNA を希釈するか、または再調製して再反応を行ってください。

V-3. 検量線作成のための Positive Control 希釈系列の作成（オプション）

コンポーネント 6. の Positive Control（2×10^5 copies/μl）を 7. の EASY Dilution（for Real Time PCR）を用いて段階希釈を行う。作製した Positive Control の希釈系列を用いて V-2. の反応液調製と反応を行い、検量線を作成する。その際、Positive Control の希釈系列は、1 反応あたり 5 μl 用いる。
作成した検量線から反応に使用したサンプル中のコピー数（目安）を算出することができる。

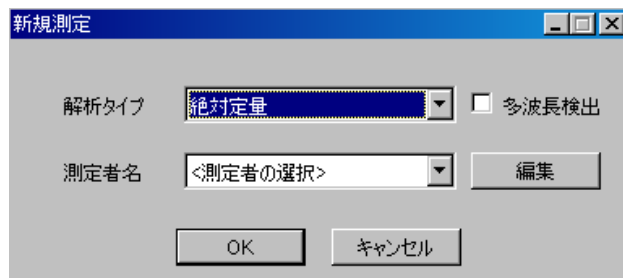
段階希釈系列の調製

1）Positive Control（2×10^5 copies/μl）と EASY Dilution（for Real Time PCR）を融解し、それぞれ均一に混和する。
2）1.5 ml チューブを 5 本用意し、2×10^4 copies/μl、2×10^3 copies/μl、2×10^2 copies/μl、2×10^1 copies/μl、2×10^0 copies/μl とラベルする。
3）それぞれの 1.5 ml チューブに EASY Dilution（for Real Time PCR）を 90 μl ずつ分注する。
4）Positive Control（2×10^5 copies/μl）より 10 μl を、2×10^4 copies/μl とラベルしたチューブに加え、均一に混和する。
5）2×10^4 copies/μl より 10 μl を 2×10^3 copies/μl とラベルしたチューブに加え、均一に混和する。順次この操作を繰り返し、希釈系列とする。
6）－ 20℃にて保存する。

V-4. リアルタイム PCR 用増幅装置による増幅および検出、判定（エリア 3 で実施）

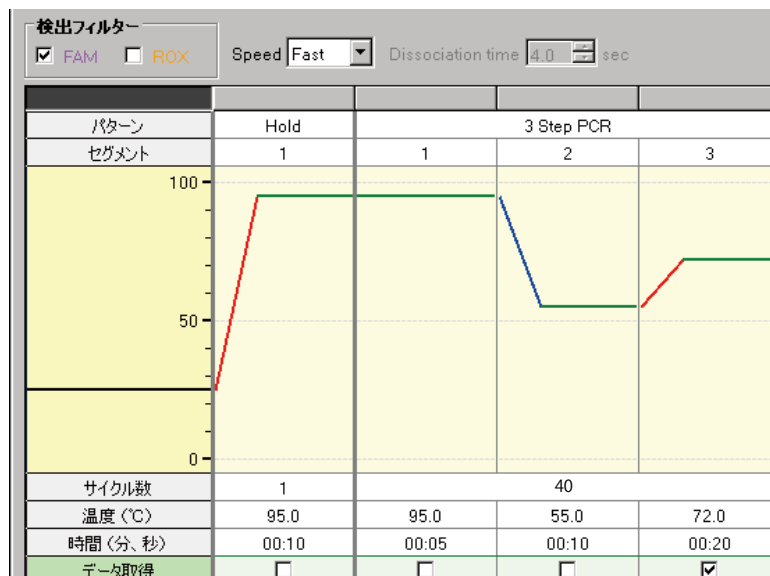
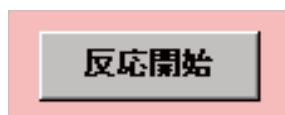
操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 用増幅装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている説明書をご確認ください。
ここでは、Thermal Cycler Dice® Real Time System（タカラバイオ）および 7500 Real-Time PCR System（Life Technologies 社）を使用した場合の簡単な操作方法について示します。

【Thermal Cycler Dice® Real Time System の場合】

（1）ランファイルを新規作成し、“ 新規測定 ” ウィンドウにおいて解析タイプ≪絶対定量≫を選択し、OK ボタンをクリックする。

＊ ≪絶対定量≫は、食品環境検査用ソフトウェア Ver.1 に搭載された機能です。Thermal Cycler Dice® Real Time System Software Ver.3.0 をご使用の場合は、< Absolute Quantification >を使用します。解析ソフトのバージョンアップが必要な場合は、弊社ウェブサイトの資料請求／ダウンロードサービス「Thermal Cycler Dice® Real Time System ソフトウェアバージョンアップのご案内」よりダウンロードしてください。

（2）反応条件設定画面で、PCR 条件および検出する蛍光フィルターの選択を画面左上の≪検出フィルター≫で行う。本製品では FAM を測定するので、FAM にチェックが入っていることを確認する。

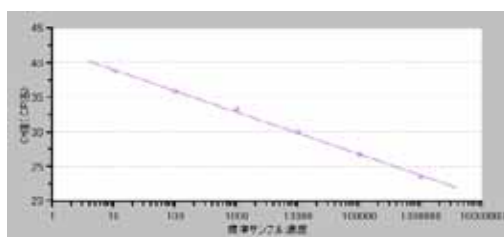
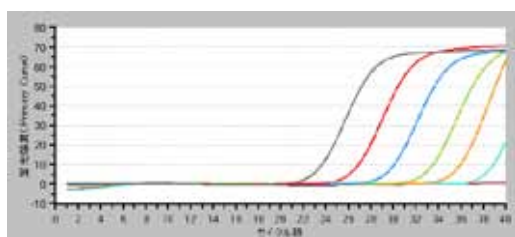
初期変性（Hold）
　Cycle：1
　95℃ 10 秒

3 step PCR
　Cycle：40
　95℃　5 秒
　55℃　10 秒
　72℃　20 秒（検出）

（3）画面右下の反応開始ボタンをクリックして反応を開始する。

（4）サンプル設定画面でサンプル情報の設定を行う。

・サンプル名：必要に応じてサンプル名などを入力する。
・サンプルタイプ：UNKN、STD、NTC から選択する。（必須）
・ターゲット設定：”複数”をはずす。Dye を”FAM”にする。
・レプリケート設定：同じサンプルを 2 連（n ＝ 2）以上で反応する場合は各々をレプリケートとして設定する。（n ＝ 2 以上の設定では必須、n ＝ 1 では任意）
・検量線設定：サンプルタイプを STD としたウェルについて、鋳型量を設定する。連続設定を使用すると入力が容易。
・Omit：反応に使用しないウェルは Omit 設定する。（必須）

（5）反応終了後、増幅曲線を確認する。ターゲット遺伝子（*tax* 遺伝子）陽性の場合、蛍光シグナルの増大が認められる。

（オプション）定量を行う場合、Positive Control を段階希釈して作製したスタンダードを用いた結果より検量線を作成する。

Positive Control を使用した増幅曲線、検量線の例

<判定>

結果／解析画面において、“データ解析”を”テキストレポート”とし、詳細項目より必要な項目を選択することで Ct 値などの情報を得ることができる。このデータで Ct 値 (CP) および Ct 値 (SDM) に数値が得られている場合、ターゲット遺伝子（*tax* 遺伝子）陽性と判断する。（Ct 値 (SDM) の数値は、サンプルにより数値が得られない場合がある。そのような場合は Ct 値 (CP) の数値と増幅曲線より判断する。）

サンプルと同時に反応を行った Positive Control で Ct 値数値表示があり、ネガティブコントロールで Ct 値数値表示なしであることを確認する。Positive Control およびネガティブコントロールで上記以外の結果が得られた場合は、検出系に問題がある、またはコンタミネーションの疑いがあるので、再反応を行う。

（オプション）定量を行った場合は、検量線のデータをもとにして、コピー数が表示される。

サンプル名	検出フィルター	Ct値(CP)	Ct値(SDM)	標準サンプル濃度	定量値(CP)	定量値(SDM)
NTC	FAM	—	—	—	—	—
std-10	FAM	37.16	37.88	1×10	1.12×10	8.83
std-10^2	FAM	34.16	34.11	1×10^2	9.12×10	1.12×10^2
std-10^3	FAM	30.79	30.73	1×10^3	9.60×10^2	1.10×10^3
std-10^4	FAM	27.57	27.55	1×10^4	9.11×10^3	9.37×10^3
std-10^5	FAM	24.03	23.99	1×10^5	1.08×10^5	1.03×10^5
std-10^6	FAM	20.8	20.7	1×10^6	1.03×10^6	9.51×10^5
Sample 1	FAM	26.31	26.28	—	2.20×10^4	2.21×10^4
Sample 2	FAM	32.93	32.94	—	2.15×10^2	2.47×10^2
Sample 3	FAM	—	—	—	—	—
Sample 4	FAM	29.97	29.92	—	1.70×10^3	1.90×10^3
Sample 5	FAM	—	—	—	—	—

スタンダード（std-10 ～ std-10^6）

サンプル（Sample 1 ～ Sample 5）

【7500 Real Time PCR System（Life Technologies 社）の場合】
（SDS ver. 1.2.1）

（1） 増幅反応は以下の手順で行う。

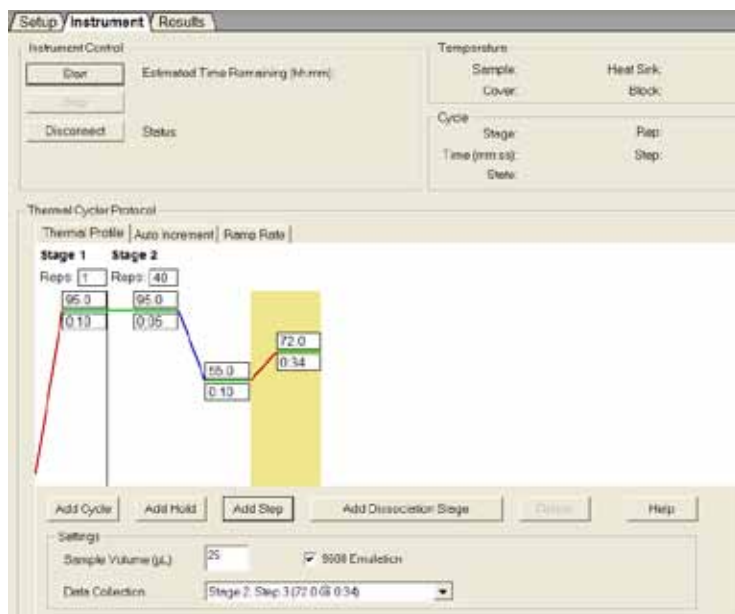
（2） New Document Wizard で Assay：Absolute Quantification（Standard Curve）を選択する。Next ＞

（3） detector として、New Detector ... から Detector Name を BLV、Reporter を FAM、Quencher を（none）にしたものを作成する。

（4） （3） で作成した Detector を Add ＞＞で Detector in Document に加える。Passive Reference は（ROX）にする。Next ＞

（5） 反応サンプルのウェルの位置を選択し、上部の Detector の Use のチェックボタンにチェックを入れる。Finish

（6） Well Inspector を表示させ、Task のプルダウンメニューより Unknown、Standard、NTC を選択する。

（7） Instrument タブをクリックし、以下の反応条件を入力する。

Stage 1：初期変性（Hold）
Reps：1
95℃ , 10 sec

Stage 2：3 step PCR
Reps：40
95℃ , 5 sec
55℃ , 10 sec
72℃ , 34 sec（検出）

Sample Volume 25 μl

(8) 反応終了後､増幅曲線を確認する。ターゲット遺伝子（*tax* 遺伝子）陽性の場合、蛍光シグナルの増大が認められる。

（オプション） 定量を行う場合、Positive Control を段階希釈して作製したスタンダードを用いた結果より検量線を作成する。

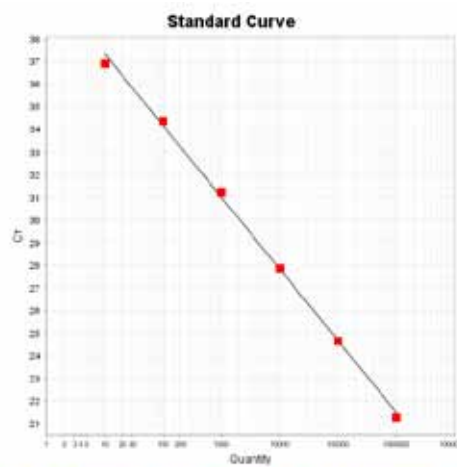
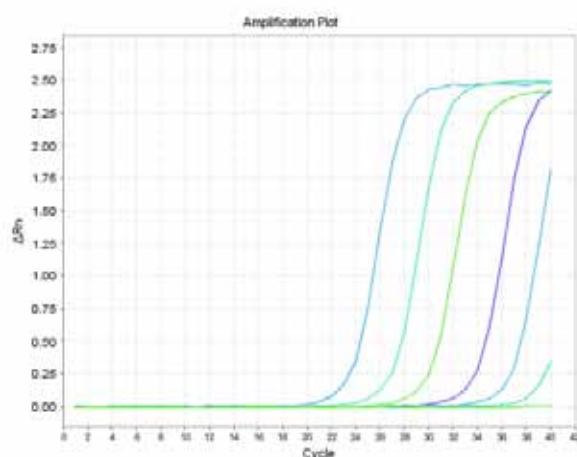
Positive Control を使用した増幅曲線、検量線の例

Setup | Instrument | **Results**

Plate | Spectra | Component | Amplification Plot | Standard Curve | Dissociation | **Report**

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty
A1		BLV	NTC	Undet.			
A2		BLV	Standard	Undet.			
A3		BLV	Standard	38.47		10.00	
A4		BLV	Standard	36.03		100.00	
A5		BLV	Standard	32.97		1000.00	
A6		BLV	Standard	30.24		10000.00	
A7		BLV	Standard	26.08		100000.00	
A8		BLV	Standard	24.00		1000000.00	
C7	10	BLV	Unknown	Undet.			
C8	11	BLV	Unknown	35.42		143.81	
C9	12	BLV	Unknown	Undet.			
E5	61	BLV	Unknown	36.18		81.14	

＜判定＞

Results タブ → Report タブを選び、Ct 値などの情報を得る。このデータで Ct に数値が得られている場合、ターゲット遺伝子（*tax* 遺伝子）陽性である。サンプルと同時に反応を行った Positive Control で Ct 値数値表示があり、ネガティブコントロール Ct 値数値表示なしであることを確認する。Positive Control およびネガティブコントロールで上記以外の結果が得られた場合は、検出系に問題がある、またはコンタミネーションの疑いがあるので、再反応を行う。

（オプション） 定量を行った場合は、検量線のデータをもとにして、コピー数が表示される。

VI. 関連製品

Thermal Cycler Dice® Real TIme System //（製品コード TP900/TP960）
96well Hi-Plate for Real Time（製品コード NJ400）
Sealing Film for Real Time（製品コード NJ500）
Plate Sealing Pads（製品コード 9090）
0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）
0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ302）
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）

VII. 注意

・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

ご注意

本製品は、Epoch Biosciences, Inc. のクエンチャーのライセンスを受け、製造・販売されています。
本製品は、生命科学研究分野、食品検査を含む工業的検査分野、環境分析、法医学や動物診断における検出用です。また、これらの分野において、第三者に検出サービスを提供するために、本製品を商業目的で使用することができます。
ヒトの医療、治療、診断や動物の医療、治療、およびバイオテロに関連する分析、患者の処置あるいは治療方法を選択するための用途には使用できません。
本製品は、Epoch Biosciences, Inc. 保有の特許（US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830）のライセンスのもと製造・販売されており、本製品と関連技術に関する権利は、上記特許の及ぶ範囲において Epoch Biosciences, Inc. に属します。下記注にある商業用途のライセンスは包含されていませんので、当該商業目的の使用には、Epoch Biosciences, Inc. からの別途ライセンスが必要です。

（注）別途ライセンスが必要な商業用途には以下の用途を含みます。
A：本製品、あるいは本製品により派生するものを販売・リース・ライセンス・その他の方法で第三者に引き渡すこと。
B：本製品、あるいは本製品により派生するものの使用権につき、第三者にリース・ライセンス・その他の権利付与をおこなうこと。
C：本製品を含有するキットを販売・リース・ライセンス・その他の方法で第三者に引き渡すこと。

ライセンスについてお問い合わせ先：
タカラバイオ株式会社
Tel 077-543-6116 Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

[L4] Quencher
This product is for measurement of amplification detection for research use only in life sciences research, industrial and environmental testing (including food industry, but excluding bio-terrorism and bio-warfare), non-human animal diagnostic testing, forensic testing and providing services to third parties who do not use the services for the purpose of (a) providing patient management or care, and in which the results of such services are not included in patient records and (b) providing bio-terrorism or bio-warfare testing; and specifically excluding, without limitation: (I) any human clinical, therapeutic or diagnostic uses and animal clinical and therapeutic uses (including any use of the results of any testing performed with any product for patient management or care, or the use of the results of the services for patient management or care) and (II) any research or services where the results of any test or assay are used for patient management, care or otherwise in making therapeutic or treatment decisions for a patient.
A portion of this product is subject to proprietary rights of Epoch Biosciences, Inc. and are made and sold under license from Epoch Biosciences, Inc. under the patents and patent applications (US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830 and corresponding patents issued in other countries).
There is no implied license for commercial use with respect to this product. A license must be obtained directly from Epoch Biosciences, Inc. with respect to any proposed commercial use of this product, and “commercial use” includes but is not limited to (A) the sale, lease, license or other transfer of this product or any material derived or produced from it, (B) the sale, lease, license or other grant of rights to use this product or any material derived or produced from it, and (C) the sale, lease, license or other transfer of kits which include this product.

[L15] Hot Start PCR
Licensed under U.S. Patent No. 5.338,671 and 5,587,287, and corresponding patents in other countries.

[L53a] Rox Reference Dye (Application Field)
Purchase of this product includes an immunity from suit under patents specified in the product insert to use only the amount purchased solely in Environmental Testing, Industrial Microbiology and also for the purchaser’s own internal research. No other patent rights are conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[M40] Thermostable RNase H
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,422,888 and its foreign counterpart patent claims.

[M46] PCR-Cycleave
This product is covered by the claims of Japanese Patent No. 4022522.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 of U.S. Patent No. 5,436,149 and its foreign counterpart patent claims.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201103Da